AUS DEM HYGIENISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT BASEL
(VORSTEHER: PROF. DR. R. DOERR)

DIE DESTILLATION DER ÜBERTRAGBAREN LYSINE (BAKTERIOPHAGEN)

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

VORGELEGT VON

ALEXANDER CAPLAZI
VON TENIGERBAD (SOMVIX), GRAUBÜNDEN

VERÖFFENTLICHT IN ZEITSCHRIFT FÜR HYGIENE, BAND 102

VERLAGSBUCHHANDLUNG JULIUS SPRINGER IN BERLIN. 1924

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag von Professor Dr. R. Doerr.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinem Vater
in Verehrung und Dankbarkeit
gewidmet

Olsen und *Yasaki* teilen in der Klinischen Wochenschrift 1923, Heft 41, mit, daß sie hochkonzentrierte lysinhaltige Bouillon (vom Lysinexponenten 8) bei niedrigen Temperaturen und unter Anwendung des Vakuums der Destillation unterworfen und auf diesem Wege Destillate erzielt haben, die gleichfalls lysinhaltig waren; der Lysinexponent (e_L) des in der Vorlage angesammelten Wassers betrug 5, eine Konzentration, die somit 1000 mal geringer war als jene der Ausgangsbouillon. An sich kann diese Beobachtung wohl kein besonderes Interesse beanspruchen; geht der Destillationsprozeß unter starkem Sieden und Schäumen vor sich, so können ins Destillat geringe Mengen der verschiedensten, in der verdampfenden Flüssigkeit vorhandenen Substanzen übergehen, ohne daß man aus dem Nachweis solcher Spuren das Recht ableiten würde, die das Destillat verunreinigenden Stoffe als „flüchtig" zu bezeichnen. Bedeutung gewannen die Angaben von *Olsen* und *Yasaki* erst durch die weitere Behauptung, daß das Lysin bei der Redestillation lysinhaltiger Destillate *quantitativ* in die gekühlte Vorlage übergeführt werden kann oder, mit anderen Worten, daß sich die Ausbeute des Destillationsprozesses bis auf 100% steigern läßt, wenn man als Ausgangsmaterial eine Lösung von Lysin in reinem oder annähernd reinem Wasser statt einer Lösung von Lysin in Nährbouillon benützt. Die zwischen diesen beiden Substraten bestehende Differenz wollen die genannten Autoren dadurch erklären, „daß das lytische Agens in der Bouillonkultur fester gebunden ist als in dem stark verdünnten Milieu des Destillates, in dem es sich anscheinend in ungebundener Form vorfindet"; als Beweis für die Richtigkeit dieser Auffassung wird u. a. angeführt, daß sich das in Destillaten enthaltene lytische Agens durch Eintrocknen nicht konzentrieren läßt, indem man im Exsiccator oder im *Faust-Heim*schen Apparat stets nur unwirksame, d. h. lysinfreie Trockenrückstände erzielt, während der vorherige Zusatz gewöhnlicher Bouillon das Eintrocknen ohne nennenswerten

Lysinverlust ohne weiteres gestattet. Bei Gegenwart der Bouillonbestandteile bleibt eben — so meinen *Olsen* und *Yasaki* — die Verflüchtigung des Lysins aus, die sonst schon bei Zimmertemperatur vor sich geht.

Nach der Darstellung von *Olsen* und *Yasaki* soll übrigens die Flüchtigkeit der übertragbaren Lysine (der Bakteriophagen *d'Herelles*) unter den präzisierten Bedingungen so hochgradig sein, daß sie ihren Lösungen in reinem Wasser nicht nur durch totales oder partielles Abdampfen des Lösungsmittels, sondern durch bloßes Durchleiten von Luft entzogen werden können. Läßt man die lysingeschwängerte Luft durch verschiedene, in Gaswaschflaschen enthaltene Flüssigkeiten streichen, so kann sie ihr Lysin wieder an letztere abgeben; dieser Übergang aus der Dampfform in den Lösungszustand findet jedoch angeblich nur dann statt, wenn man die Luft durch eisgekühlte Bouillon durchleitet; Bouillon von 37° oder Kochsalzlösung vermag das in Luft verteilte Lysin nicht zurückzuhalten. Zeigen die Lysine tatsächlich das geschilderte Verhalten, dann müssen natürlich Versuchsanordnungen möglich sein, bei denen lysinbeladene Luft unbehindert eine oder mehrere Waschflaschen passiert, um schließlich ihr Lysin in einer letzten (mit eisgekühlter Bouillon gefüllten) Waschflasche zurückzulassen. *Olsen* und *Yasaki* verzeichnen de facto derartige Ergebnisse; sie sahen aus einem lysinhaltigen Destillat (einer wässerigen Lysinlösung) das Lysin beim Durchleiten von Luft schwinden und mit Überspringung einer Waschflasche in einer zweiten auftreten, und zwar „in dem Maße", in welchem es sich im Destillat verminderte. Der Wortlaut dieser Angabe könnte zu der irrigen Auffassung verleiten, daß *Olsen* und *Yasaki* das durch Luftdurchleitung verlorene Lysin durch Waschen der Luft in eisgekühlter Bouillon *quantitativ* wiedergewonnen haben; aus den angeführten Versuchsprotokollen ergibt sich jedoch, daß in der gekühlten Vorlage nur Spuren der aus dem Destillat verschwundenen Lysinquanten nachweisbar wurden[1]). Abgesehen davon konnten *Doerr* und *Rose* zeigen, daß das Verschwinden des Lysins aus sog. Lysindestillaten bei Luftdurchleitung nicht durch die Flüchtigkeit der Lysine bedingt ist, sondern darauf beruht, daß diese Stoffe schon durch niedrige Temperaturen zerstört werden, wenn sie nicht in Bouillon oder anderen salzhaltigen Medien, sondern in reinem

[1]) So z. B. wurde in einem Experiment durch 100 ccm lysinhaltiges Destillat vom Titer 10^{-5} Luft durchgeleitet, wobei der Titer nach 5 Std. auf 10^{-4}, nach 10 Std. auf 10^{-3} sank; in der Vorlage, welche 30 ccm gewöhnliche Nährbouillon enthielt, betrug der Lysintiter nach 5 Std. 10^{-1}, nach 10 Std. 10^{-2}. Es war also nur der zehntausendste bzw. der tausendste Teil der Lysineinbuße des Destillates in der Vorlage zu finden; davon, daß das Lysin auf der einen Seite in dem Maße zunimmt, in welchem es sich auf der anderen vermindert, kann gar keine Rede sein.

oder annähernd reinem Wasser suspendiert resp. gelöst sind; das Durchleiten der Luft ist unter solchen Umständen für den Lysinschwund irrelevant und wirkt auch nicht einmal nachweislich beschleunigend.

Die von *Doerr* und *Rose* beobachtete Erscheinung, daß Lysine in Abwesenheit von Salzen und Eiweißstoffen schon durch niedrige Wärmegrade vernichtet oder irreversibel inaktiviert werden, während sie durch Salze und andere Stoffe der Bouillon geschützt relativ hohen Temperaturen längere Zeit Widerstand leisten, liefert auch eine einfache Erklärung dafür, daß sich zwar lysinhaltige Bouillon, nicht aber lysinhaltiges Wasser ohne große oder gar totale Lysineinbuße bis zur Trockene eindampfen läßt; nicht eine vom Lösungsmittel abhängige Flüchtigkeit der Lysine, sondern ihre je nach der Beschaffenheit des Milieus innerhalb weiter Grenzen schwankende Thermoresistenz stellt die wahre Ursache des beschriebenen Verhaltens dar. An die Intervention dieses Faktors hatten indes *Olsen* und *Yasaki* gar nicht gedacht und daher auch entsprechende Kontrollen in ihren Versuchen unterlassen. Sie halten die Resultate, die sie mit Luftdurchleitung, Vakuumdestillation lysinhaltiger Bouillon und Redestillation der gewonnenen Destillate erzielten, für ausreichend, um darauf den Schluß zu basieren, daß das *d'Herelle*sche Agens — zumindest unter bestimmten Bedingungen — flüchtig sei. Die Möglichkeit, daß in das Destillat kleinste verspritzende Tröpfchen oder Bläschen der Ausgangsflüssigkeit übergehen könnten, hatten *Olsen* und *Yasaki* zwar erwogen, glaubten aber nicht, daß dieser Vorgang den Lysingehalt der Destillate bedinge. Einerseits vermochten sie durch den bloßen Übergang vereinzelter winziger Tröpfchen die Beobachtung nicht zu erklären, daß die Redestillation eines lysinhaltigen Destillates eine 100proz. Ausbeute zu liefern imstande ist, andererseits erhielten sie bei Kontrolldestillationen von Trypaflavinlösungen niemals Destillate, in denen sich der Farbstoff colorimetrisch nachweisen ließ, obzwar die Ausgangslösungen diesen Nachweis noch nach millionfacher Verdünnung gestatteten. Diese Kontrollversuche mit Farbstoffen wird man indes kaum als Gegenbeweis gelten lassen können. Eine Lysinbouillon vom $e_L = 8$ (dieser Titer ist bei dem Dysenteriestamm Lauda und dem zugehörigen Lysin, mit welchem *Olsen* und *Yasaki* gearbeitet haben, die Regel) gibt das *d'Herelle*sche Phänomen noch nach einer Verdünnung von 1 : 1 000 000 000 oder richtiger in einer absoluten Menge von 10^{-8} ccm· nach den Untersuchungen von *Gratia* und *de Kruif*, die im Tatsächlichen von *Doerr* und *Zdansky* bestätigt wurden, entscheidet ja nicht der Verdünnungsgrad über die Nachweisbarkeit des Lysins, sondern die in einem beliebigen Volum enthaltene absolute Menge. Die kleinste Quantität einer Lysinbouillon von der definierten Beschaffenheit, die noch eine positive Reaktion gibt, und die geringste colorimetrisch

nachweisbare Menge der von *Olsen* und *Yasaki* benützten Trypaflavinlösung gehören demnach total verschiedenen Größenordnungen an; abgesehen davon sind die Methoden des Nachweises der beiden Stoffe auf völlig differente Prinzipien aufgebaut.

Die Annahme, daß die übertragbaren Lysine (Bakteriophagen) flüchtige Substanzen seien, setzt sich mit allen, aus den bisherigen Ergebnissen der Bakteriophagenforschung abgeleiteten Vorstellungen über die Natur dieser Körper in Widerspruch und ist überdies — vom chemisch-biologischen Standpunkt betrachtet — schon an sich so unwahrscheinlich, daß zahlreiche Nachprüfungen der experimentellen Grundlagen dieser Hypothese vorauszusehen waren. In der Tat haben *Doerr* und *Rose* (l. c.) berichtet, daß sie bei Vakuumdestillationen von Lysinbouillons überwiegend negative Resultate bekommen hätten und daher der Richtigkeit der von *Olsen* und *Yasaki* mitgeteilten Befunde sowie noch mehr ihrer Deutung skeptisch gegenüberstünden. Diese Arbeiten wurden fortgesetzt und zum Abschlusse gebracht; ich übernahm es, die zahlreichen, verschiedenartig angeordneten Versuche zusammenzustellen und einem weiteren Kreis von Interessenten durch die Publikation in dieser Zeitschrift zugänglich zu machen. Während der Niederschrift dieser Mitteilung sind allerdings bereits Veröffentlichungen von anderer Seite (*Gildemeister* und *Herzberg*, *d'Herelle*, *Borchardt*) erschienen, die sich mit dem gleichen Thema befassen und durchwegs zu einer entschiedenen Ablehnung der Hypothese von *Olsen* und *Yasaki* gelangen. Da aber die letztgenannten Autoren die Stichhaltigkeit der Argumente von *Gildemeister* und *Herzberg* sowie von *Borchardt* nicht anerkennen (die Versuche von *d'Herelle* waren ihnen offenbar noch nicht bekannt) und da sich auch die Angaben der die Flüchtigkeit der Lysine bestreitenden Experimentatoren mit unseren Erfahrungen nicht völlig decken, halten wir die Wiedergabe der letzteren für angezeigt, wollen uns aber kurz fassen und nur das Wesentliche hervorheben.

Doerr und *Zdansky* hatten zwecks Beantwortung anderer Fragen wiederholt versucht, Lysinbouillons von verschiedenem Titer durch Abdampfen ihres Wassergehaltes im Vakuum auf $^1/_{20}$ oder noch geringere Bruchteile ihres Ausgangsvolumens einzuengen und die Lysine auf diese Weise zu konzentrieren (nicht veröffentlichte Experimente); wurde die Einengung nicht bis zur gänzlichen Austrocknung fortgesetzt, so ließ sich mit Hilfe der üblichen Auswertungstechnik (*Appelmans-Werthemann*) im Rückstande zuweilen ein höherer, meist der gleiche, nie aber ein niedrigerer Lysintiter als im Ausgangsmateriale nachweisen. Dieses Verhalten konnte natürlich nicht auf die a priori so fernliegende Vermutung leiten, daß die Lysine leichtflüchtige Stoffe seien, und *Doerr* und *Zdansky* unterließen es daher, die abdestillierenden Dämpfe

zu kondensieren und auf ihren Lysingehalt zu prüfen. Bei dieser Gelegenheit hatte sich aber herausgestellt, daß ein Überschäumen einer erwärmten und unter Vakuum gesetzten Bouillon nur bei besonderer Aufmerksamkeit vermieden werden kann. Bei der Nachprüfung der Angaben von *Olsen* und *Yasaki* verwendeten wir daher als Destillierkolben große, 2—3 l fassende, starkwandige Glasflaschen, in welchen nur kleine Mengen Lysinbouillon zur Verdampfung kamen. Das Einleiten von Luft durch eine Capillare wurde, da es das Aufschäumen und die Bildung platzender Blasen begünstigt, unterlassen; allerdings mußten dafür bei den ersten Versuchen einige unangenehme, durch Siedeverzug bedingte Zwischenfälle in Kauf genommen werden.

Der erste derartige Versuch hatte ein *positives* Ergebnis; doch war die Menge Lysin, die sich im **Gesamtvolum** des abdestillierten Wassers nachweisen ließ, *geradezu verschwindend* und entsprach nicht mehr als 3×10^{-9} ccm der Ausgangsbouillon („Dys.-Lauda"-Lysin vom Titer $e_L = 9$). Wir waren natürlich in erster Linie bestrebt, die Lysinausbeute bei solchen *primären Destillationen von Lysinbouillons* zu steigern; eine beträchtliche Steigerung der Ausbeute wäre ja an sich für die ganze Deutung des Vorganges prinzipiell wichtig gewesen und hätte uns überdies das Material für die (nach *Olsen* und *Yasaki*) weit leichter zu bewerkstelligenden Redestillationen geliefert. Es wurden daher die Bedingungen der Destillationen (zum Teil des erwähnten Lysins „Dys.-Lauda", zum Teile eines von *Bordet* stammenden Colilysins) in der mannigfachsten Weise variiert; um das Übergehen größerer Lysinmengen zu erzwingen, änderten wir den p_H der Lysinlösungen, die Temperaturen des Wasserbades, in welches der Destillierkolben eintauchte, und endlich auch den negativen Druck des Vakuums. Die Temperaturen des Wasserbades bewegten sich zwischen 40 und 66°, das Vakuum zwischen 12 und 60 mm Hg, die Temperaturen der Kühler und der zur Aufnahme des Destillates bestimmten Vorlagen zwischen — 2 und + 13°. Als Helme kamen einfache Kniestücke, Raitmairsche Aufsätze und ein 40 cm hohes Rohr zur Anwendung; letzteres hatte 3 kugelige Ausbuchtungen, deren untere Öffnungen durch freie Glasperlen verlegt waren, so daß ein direktes Überspritzen unmöglich wurde. Auf diese Weise wurden noch 20 Destillationen ausgeführt. Von diesen hatten 13 ein *völlig negatives*, und *nur 7 ein positives* Ergebnis; bei der Zusammenstellung stellte sich ferner heraus, *daß die positiven Resultate unabhängig von irgendeinem der variierten Faktoren gleichmäßig über alle Versuchsanordnungen zerstreut waren.*

Schon aus diesem Verhalten war mit Sicherheit zu schließen, daß das Auftreten von Lysin in den Destillaten nicht durch seine Flüchtigkeit, sondern nur durch irgendwelche akzidentelle Umstände bedingt sein konnte. Wenn eine Substanz de facto flüchtig ist, dann muß sich

diese Eigenschaft bei Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen ausnahmslos feststellen lassen. Wir bemerken dazu ausdrücklich, daß wir, um den qualitativen Nachweis von Lysin in den Destillaten zu führen, mindestens 10 ccm derselben, in der weitaus überwiegenden Zahl der Experimente sogar *die gesamte Masse der Destillate* verarbeitet haben, so daß die Aussage über den negativen Versuchsausfall wohl als einwandfrei zu betrachten ist (vgl. hierzu *Gratia* und *de Kruif*, *Doerr* und *Zdansky*).

Unsere Absicht, die Lysinausbeute zu erhöhen, war übrigens auch durch die 7 positiven Versuche nicht erfüllt worden. Nur in einem einzigen Falle wies das Destillat einen hohen Lysintiter auf; gerade dieses Experiment mußte aber ausgeschaltet werden, da sich im Destillate Kochsalzmengen chemisch nachweisen ließen, die den Beweis für eine grobe Verunreinigung durch Überschäumen erbrachten. Von den restlichen 6 Destillaten hatten 4 den Titer Null, eines den Titer 2 und eines den Titer 4; auch das letztgenannte Destillat enthielt *in seiner Gesamtmasse* nicht mehr Lysin, als in 0,02 ccm der Ausgangsbouillon nachweisbar war.

3 der lysinhaltigen Destillate unterwarfen wir der *Redestillation*; doch fielen die mit der Gesamtmenge der Redestillate angestellten qualitativen Lysinproben absolut negativ aus.

Wir sind somit nicht in der Lage, 2 der wichtigsten Angaben von *Olsen* und *Yasaki* zu bestätigen, indem es uns einerseits *nicht* gelang, in Destillaten aus Lysinbouillon *regelmäßig* Lysin nachzuweisen und indem die Redestillation lysinhaltiger Destillate nicht nur keine 100% Ausbeute gab, sondern vielmehr ganz mißglückte.

Ebenso negativ verliefen die Versuche, Lysin mit Hilfe von Luftdurchleitung aus einem Gefäß in das andere zu überführen. Zunächst verwendeten wir zu diesem Zwecke eine Lysinbouillon vom $e_L = 8$, die sich in einer Waschflasche befand und durch welche reiner O durchperlte; der O passierte dann 2 weitere mit Bouillon gefüllte Waschflaschen. O statt Luft wurde benützt, um einen evtl. oxydierenden Einfluß des Luft-O deutlicher in Erscheinung treten zu lassen. Es nahm indes das Lysin in der 1. Flasche nicht ab und trat in den beiden folgenden nicht auf. Da uns „Destillate“ von hohem Lysintiter, wie sie von *Olsen* und *Yasaki* für ihre Durchleitungsversuche verwendet worden waren, nicht zur Verfügung standen, suchten wir die von diesen Autoren angegebene Versuchsanordnung in der Weise zu kopieren, daß wir Lysinbouillon in entsprechendem Ausmaße mit destilliertem Wasser verdünnten; wir fühlten uns dazu um so mehr berechtigt, als die sog. „Lysindestillate“ nach unserer Überzeugung ohnehin nichts anderes sein können als destilliertes, durch Spuren von Lysinbouillon verunreinigtes Wasser. Ein solches Experiment mag hier kurz skizziert werden:

Versuch.

Eine „Dys.-Lauda"-Lysinbouillon vom $e_L = 9$ wurde 10 000fach mit Aq. dest. verdünnt; der Titer der verdünnten Bouillon betrug $e_L = 5$. Je 50 ccm der Verdünnung wurden in die Gaswaschflaschen I und II gefüllt. I diente als Kontrolle und stand ebenso wie II in einem Wasserbad von 37°; die zu- und abführenden Glasröhren von I waren durch Wattepfröpfe verschlossen und standen mit keinem anderen Gefäß in Verbindung. *Durch II dagegen wurde Luft geleitet,* die vorher durch Wattefilter entkeimt worden war; in den ersten 6 Stunden passierten 4,2, in den nächsten 5 Stunden 5,8, schließlich innerhalb von 9 weiteren Stunden noch 6 l. Aus Flasche II wurde die Luft durch Flasche III geleitet (Füllung: 30 ccm sterile Bouillon; Temperatur: Wasserbad von 37°) und von dieser durch Flasche IV, die ebenfalls 30 ccm sterile Bouillon enthielt, aber in einem Wasserbad von 0° stand.

Vor Beginn der Luftdurchleitung sowie nach 6, 11 und 20 Stunden wurden aus sämtlichen Flaschen Proben entnommen und ihr Lysingehalt nach *Appelmans-Werthemann* titriert:

Lysintiter (e_L) in	Nach 0 Std.	6 Std.	11 Std.	20 Std.
Flasche I (Kontrolle bei 37° C)	5	3	2	nicht nachweisbar
Flasche II (37° C)	5	3	2	„ „
Flasche III (37° C)	n. n.	n. n.	n. n.	„ „
Flasche IV (0° C)	„	„	„	„ „

In III und IV war somit nie Lysin vorhanden, d. h. *eine Überleitung durch Luft konnte nicht festgestellt werden.* In der Flasche II schwand das Lysin allerdings konform den Angaben von *Olsen* und *Yasaki,* aber nicht wegen seiner Flüchtigkeit, sondern — wie nach den Untersuchungen von *Doerr* und *Rose* zu erwarten war — weil es durch 37° im salzarmen Medium zerstört wurde; in der Kontrollflasche, durch welche keine Luft durchgeleitet wurde, vollzog sich dementsprechend die Lysinverminderung im gleichen Tempo.

Wenngleich nach diesen bereits im November 1923 abgeschlossenen Versuchen die Annahme von der Flüchtigkeit der Lysine als unhaltbar angesehen werden durfte, schien es uns doch erwünscht, direkt nachweisen zu können, daß das gelegentliche Auftreten von Lysin in den Destillaten auf einer Verunreinigung der letzteren durch Lysinbouillon beruhe, und Versuchsanordnungen zu finden, die derartige Verunreinigungen sicher ausschließen. (Dieser Teil der Arbeiten erlitt aus äußeren Gründen eine vorübergehende Unterbrechung.)

Daß beim Platzen von Blasen auf dem Flüssigkeitsspiegel *kleinste Bouillontröpfchen* entstehen, die durch den erteilten Impuls weit fortgeschleudert werden und auf diese Weise *direkt* in die Abzugswege des

Wasserdampfes und damit auch in das Destillat gelangen, kann nicht als eine für alle Fälle ausreichende Erklärung gelten; denn das Lysin zeigte sich in der Vorlage auch bei Verwendung des *Raitmair*schen Aufsatzes oder des oben beschriebenen dreikammerigen Helmes, der ein direktes Überspritzen wohl mit Sicherheit ausschloß. Dagegen wäre ein anderer Weg möglich. Betrachtet man einen Destillierkolben beim Beginne des Siedens unter seitlich einfallendem Licht, so wird man oft gewahr, daß der Raum oberhalb des Flüssigkeitsniveaus von einem dichten, durch Kondensation des entweichenden Wasserdampfes entstehenden Nebel erfüllt ist. Die Bläschen resp. Tröpfchen, aus denen sich dieser Nebel zusammensetzt, können aber leicht durch die von der siedenden Bouillon verschleuderten Flüssigkeitspartikel *sekundär* infiziert und dann von der Vakuumpumpe aspiriert werden; daß sie sich als Transportmittel für Bakterien und Bakteriensporen, also für Gebilde eignen, deren Gewicht erheblich größer sein muß als das der Lysinelemente, wissen wir ja bereits seit *Flügges* klassischen Arbeiten (vgl. dazu auch die neueren Publikationen von *Dold*, *v. Angerer* u. a.).

Von derartigen Erwägungen geleitet, bemühten wir uns Sporen von Bact. megatherium oder Staphylokokken unter Bedingungen, welche den Übertritt von Lysin in das Destillat gestatteten, in die Vorlagen überzuführen. Solche „Modellversuche" hätten — ein positives Resultat vorausgesetzt — besonderen Wert besessen; sie schlugen jedoch ausnahmslos fehl. Wir gingen dabei so vor, daß wir Lysinbouillons mit beträchtlichen Mengen von Sporen oder Mikrokokken versetzten und die Gemische der Vakuumdestillation unterwarfen; unter einer größeren Zahl von Experimenten dieser Art hatten wir 6 zu verzeichnen, in denen im Destillat Lysin auftrat (wobei zweimal der e_L 2 erreicht wurde); die Bakterien des Ausgangsmateriales fehlten aber auch in diesen 6 Destillaten. Allerdings bestand zwischen dem Lysin- und dem Bakteriengehalt der Ausgangsflüssigkeiten insofern ein gewisses Mißverhältnis, als der Lysintiter (e_L) 10 betrug, während der Bakteriengehalt nur soweit erhöht werden konnte, daß 10^{-8} ccm in einer mit dieser Menge beimpften Bouillon Wachstum hervorrief; brachte man noch größere Sporen- oder Bakterienmengen in die Lysinbouillons, so verlor die Suspension infolge starker Verklumpungsphänomene ihren homogenen Charakter. Die Rechnung ergab aber, daß wenigstens bei den beiden Destillaten mit dem $e_L = 2$ die Differenz der Konzentrationen von Lysin und Mikroben im Ausgangsmaterial nicht dafür verantwortlich gemacht werden konnte, daß die Destillate nur Lysin, aber keine Mikroben enthielten; 10 ccm der betreffenden Destillate hätten vielmehr mindestens *einen* entwicklungsfähigen Keim enthalten müssen, falls unsere Vorstellung vom Mechanismus der vermeintlichen Lysindestillation richtig war und falls Bakterien und Lysin im selben

Verhältnis in das Destillat übertreten, in welchem sie im Destillierkolben vermengt waren. Offenbar trifft letztere Prämisse, solange man Elemente von den Dimensionen der Staphylokokken oder Megatheriumsporen benützt, nicht zu; ein mit Organismen dieser Größenordnung beladenes Tröpfchen oder Bläschen hat naturgemäß weit geringere Chancen, durch die Stenosen und Krümmungen des zurückzulegenden Weges ungefährdet hindurchzuschlüpfen, als ein bloß mit einer Lysinpartikel beschwertes.

In Anbetracht dieser Mißerfolge sind wir dann dazu übergegangen, geeignete Filter zwischen Destillierkolben und Vorlage einzuschalten, welche die Destillation nicht hemmen, die Passage der infizierenden Bläschen resp. Tröpfchen jedoch unmöglich machen sollten. Wie erwähnt, genügt zu diesem Zwecke der *Raitmair*sche Aufsatz ebensowenig wie der kompliziertere dreikammerige Helm oder die Verwendung eines mit Glaswolle fest angefüllten Kniestückes; der Prozentsatz der lysinhaltigen Destillate wird zwar kleiner, aber er wird eben nicht gleich Null, worauf es der ganzen Sachlage nach ankommt. Wir befinden uns mit dieser Angabe im Gegensatze zu *Gildemeister* und *Herzberg*, welche behaupten, daß man bei Verwendung eines *Raitmair*schen Aufsatzes und bei Hinweglassung der Siedeverzugscapillare stets nur lysinfreie Destillate erzielt; wir verzeichneten unter Anwendung dieser beiden Sicherheitsmaßnahmen nicht weniger als 9 positive Resultate. Diese Differenz mag zum Teil auf der Zahl unserer Einzelversuche beruhen, ist aber sicher auch in anderen Momenten begründet, vor allem im höheren Lysingehalt unseres Ausgangsmateriales ($e_L = 10$), in der Art des Lysinnachweises und in der Beachtung der Möglichkeit von Lysinzerstörungen durch destilliertes Wasser. *Gildemeister* und *Herzberg* weisen das Lysin mit der (von *Doerr* wiederholt als nicht ausreichend bezeichneten) Plattenmethode nach und benützen als Sicherheitskontrolle außerdem die Titration in Bouillonröhrchen nach *Appelmans* und *Wertheman*; letztere Methode leistet zwar bei der Auswertung (Titerbestimmung) von Lysinbouillon vortreffliche Dienste, genügt aber nicht, um den Beweis zu führen, daß eine vorgelegte größere Flüssigkeitsmenge (z. B. 25 ccm) wirklich völlig lysinfrei ist. Um dies konstatieren zu können, muß vielmehr das *gesamte Flüssigkeitsquantum* untersucht werden, da einem sonst notwendigerweise die Fälle entgehen, in welchen Lysin zwar vorhanden ist, aber in einer so niedrigen Konzentration, daß 1 ccm (die geringste im Titrationsverfahren nach *Appelmans-Wertheman* geprüfte Menge) keine Lyse herbeiführt. Aus den leider nur wenig beachteten Arbeiten von *Gratia* und *de Kruif* sowie von *Doerr* und *Zdansky* ergibt sich das derzeit nicht allgemein verbreitete Verständnis für diese Verhältnisse von selbst, Verhältnisse, deren praktische Bedeutung durch folgende Beispiele belegt werden mag.

Wir untersuchten ein Destillat, dessen Gesamtmenge 28 ccm betrug; in einer Partie desselben, und zwar in 12 ccm ließ sich Lysin nachweisen, der Rest von 16 ccm war lysinfrei. Ein zweites Destillat von 36 ccm Volum teilten wir in 7 Teile zu 5 und einen Teil zu 1 ccm: die Aussaat in Bouillon und die Beimpfung mit Bakterien ergab bei 5 Teilen zu 5 ccm Lyse, in den übrigen 3 Proben ungehemmtes Wachstum. Hätten wir von jedem der beiden Destillate nur einen Kubikzentimeter in der üblichen Weise auf Lysin geprüft, so wären wir mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer negativen Aussage genötigt gewesen.

Gratia und *de Kruif* sowie *Doerr* und *Zdansky* haben auseinandergesetzt, daß Beobachtungen dieser Art gewisse Schlüsse auf den diskontinuierlichen Verteilungszustand der in Wasser dispergierten Lysine und (im Vereine mit dem geringen Diffusionsvermögen dieser Stoffe) auf eine relativ bedeutendere Größenordnung ihrer Partikel gestatten, die man sich keinesfalls als Moleküle von niedrigem Gewicht vorstellen darf. Dann können aber die Lysine auch nicht Substanzen sein, die so flüchtig sind, daß sie sich aus ihren Lösungsmitteln durch bloßes Durchleiten von Luft austreiben lassen. Dies sei in parenthesi bemerkt.

Zu den Ergebnissen von *Gildemeister* und *Herzberg* zurückkehrend möchten wir nochmals auf eine Fehlerquelle hinweisen, die fast kein in dieser Richtung arbeitender Experimentator eliminiert hat: die Möglichkeit nämlich, daß zwar Lysin in die Vorlage übertritt, daß es aber durch das dort angesammelte destillierte Wasser und die herrschende Temperatur vorzeitig zerstört wird. Nach *Doerr* und *Rose* gehen Lysine in 9 Std. bei 37° völlig zugrunde, wenn man sie dadurch in ein salzarmes Milieu bringt, daß man eine konzentrierte Lysinbouillon mit destilliertem Wasser bis zum Titer $e_L = 4$ verdünnt; und neuere Versuche von *Doerr* und *Rose* sowie von *Zdansky* beweisen, daß solche Deteriorierungen auch noch bei niedrigeren Temperaturen vor sich gehen, wenn man die Einwirkungsdauer entsprechend verlängert. Man muß daher damit rechnen, daß destilliertes Wasser auch noch bei 0° schädigend wirken und speziell minimale Lysinspuren so weit verändern kann, daß sie sich dem Nachweise entziehen. Da jedoch *Doerr* und *Rose* angeben, daß man diese Lysinzerstörung durch Zusatz von Salzgemischen oder von Bouillon verhindern kann, haben wir in unseren späteren Versuchsserien vor Beginn der Destillation in die Vorlagen einige Kubikzentimeter steriler Nährbouillon eingefüllt. Diese Maßnahme hatte eine überraschende Steigerung der positiven Destillationsergebnisse zur Folge. Gleich die beiden ersten Versuche dieser Art (Raitmair-Aufsatz!) fielen positiv aus und in einer weiteren, aus 11 Einzelversuchen bestehenden, mit einer besonderen Filterapparatur ausgeführten Reihe

erhielten wir nur 3 wirklich lysinfreie Destillate, während in der ersten Serie ohne Stabilisierung des ins Destillat übertretenden Lysins auf 7 positive 13 negative Fälle kamen.

Da der *Raitmair*sche Aufsatz und ähnliche Vorkehrungen den Übertritt von Lysin nicht sicher verhinderten, schalteten wir zwischen den Destillierkolben, der einen *Raitmair*-Aufsatz trug, und die Vorlage einen zweiten Kolben, der im gleichen Wasserbade wie der Destillierkolben gehalten wurde und gleichfalls mit *Raitmair*-Aufsatz versehen war; dieser Zwischenkolben war bis auf 1,5 cm Höhe mit Glasperlen und darüber mit festgepreßter Glaswolle bis auf $^2/_3$ seiner Höhe gefüllt, so daß die aus dem Destillierkolben kommenden und auf den Boden des Zwischenkolbens geleiteten Dämpfe diese Schichten passieren mußten, bevor sie durch den zweiten *Raitmair*-Aufsatz in den Kühler und durch diesen in die Vorlage eintreten konnten. In den Vorlagen befand sich (zwecks Verhütung der Lysinzerstörung im destillierten Wasser) stets soviel sterile, vor Beginn des Versuches eingefüllte Bouillon, daß sie durch das während des Versuches abdestillierende Wasser eine höchstens 5—7fache Verdünnung erfuhr. Die 11 mit dieser Apparatur durchgeführten Destillationen lieferten aber — wie bereits an anderer Stelle erwähnt — nur 3 lysinfreie Destillate; der Lysinexponent der 8 lysinhaltigen Destillationsprodukte betrug 4 mal 1, 2 mal 0 und in 2 Fällen war die nachweisbare Lysinmenge noch geringer. Wir dachten angesichts dieser keineswegs erwarteten Befunde zunächst an eine ungenügende Reinigung der Apparatur; wenn auch jeder Bestandteil derselben im Autoklaven bei 120° sterilisiert wurde, wäre es doch denkbar gewesen, daß eingetrocknete Lysinreste auch dieser Prozedur standgehalten hätten, da Lysine im trockenen Zustande erst durch 135° sicher vernichtet werden. Um Gewißheit zu erlangen, gingen wir so vor, daß wir bei einer Reihe von Versuchen in den Destillierkolben vorerst 20 ccm gewöhnliche sterile Nährbouillon brachten und das in derselben enthaltene Wasser im Vakuum in die Vorlage, in der sich 5 ccm Bouillon befanden, abdestillierten; dieser „Vorlauf" wurde jedesmal gesondert auf Lysin untersucht, war aber stets absolut lysinfrei. Erst nach völliger Eintrocknung der Bouillon im Destillierkolben und nach Entfernung des Vorlaufes aus der gekühlten Vorlage wurde die gleiche Apparatur ohne neuerliche Reinigung in Betrieb gesetzt; vorher kam natürlich Lysinbouillon in den Destillierkolben, gewöhnliche Bouillon in die Vorlage.

Das unter diesen Kautelen im Destillat erscheinende Lysin mußte daher aus dem Destillierkolben stammen und den ganzen komplizierten Weg durch das Gewirr von Glasfäden und Glasstaub, das in der zwischengeschalteten Filterflasche enthalten war, zurückgelegt haben. Allerdings war die bei derartigen Versuchsanordnungen übergeleitete Lysinmenge

verschwindend und betrug höchstens (bei einem von 4 positiven Versuchen) $\frac{7}{10^9}$ der im Ausgangsmaterial vorhandenen Quantität, war somit schon dadurch (wie auch durch eine Anzahl negativer Resultate) zu einer akzidentellen Verunreinigung gestempelt. Gerade deshalb kommt man aber zu der Einsicht, daß bei *allen* Destillationen, bei denen die Ausgangsflüssigkeit ins Sieden gerät (dazu gehören natürlich auch die Vakuumdestillationen), *nicht-flüchtige* Stoffe in das Destillat gelangen können und daß dies um so leichter und ausgiebiger geschieht, je kleiner die Elemente dieser Stoffe sind, je geringer ihr Gewicht und je kürzer und einfacher der Weg ist, den sie zu passieren haben. Selbstverständlich kommt auch sehr viel auf die Empfindlichkeit der Methoden an, welche zum Nachweis solcher Stoffe zur Verfügung stehen; gestatten diese Verfahren schon den Nachweis eines einzigen oder einiger weniger Teilchen, wie das bei den Lysinen zuzutreffen scheint, dann überzeugt man sich durch das Experiment, daß eine absolut sichere Zurückhaltung solcher Substanzen durch Verlängerung, Krümmung oder Stenosierung des Weges der entweichenden Wasserdämpfe kaum möglich ist. Es ist uns zwar schließlich gelungen, in einer Versuchsserie ausnahmslos lysinfreie Destillate zu erzielen, indem wir nicht nur die eben beschriebene Filterflasche benützten, sondern außerdem das zu derselben führende Glasrohr mit Glaswolle vollstopften, wobei gleichzeitig die zum Eindampfen von 20 ccm Lysinbouillon notwendige Zeit von 1 auf 4 bis 6 Stunden verlängert wurde; wir möchten aber nach unseren sonstigen Erfahrungen glauben, daß auch damit nur eine Verminderung, nicht aber eine sichere Verhütung der Gefahr einer Verunreinigung der Destillate mit Lysin erzielt wird.

Ganz ausschalten läßt sich diese Gefahr nur dadurch, daß die Destillation unter Bedingungen vor sich geht, welche das Blasenspringen und Verspritzen der Lysinbouillon im Destillierkolben ausschließen. Dies läßt sich auf zweierlei Art bewerkstelligen.

Bei Vakuumdestillationen kommt es in der Regel nur während zweier Phasen zur Schaumbildung: im Beginne, wenn infolge des langsam absinkenden Luftdruckes der Siedepunkt erreicht wird, und gegen das Ende, wenn die Eintrocknung fast beendet ist und ein großer Teil der Bodenfläche frei liegt; speziell während dieser letzten, kurz dauernden Periode erfolgt noch ein heftiges Aufsieden, daß man auch nachträglich daran erkennen kann, daß die Wände des Destillierkolbens bis hoch hinauf die eingetrockneten Spuren der in diesen letzten Minuten verspritzten Massen des zähflüssigen Rückstandes zeigen. Zwischen beide Phasen ist ein Intervall eingeschaltet, während dessen der Spiegel der Flüssigkeit, wenn er keinen groben Erschütterungen ausgesetzt ist, ruhig und eben bleibt. Man kann nun die in diesen 3 Epochen

überdestillierenden Dämpfe gesondert auffangen und auf ihren Lysingehalt prüfen. Natürlich muß zwischen der ersten und zweiten, ebenso wie zwischen der zweiten und dritten Fraktion die gesamte Apparatur mit Ausnahme des Destillierkolbens (also Helm resp. Kniestück, Kühler und Vorlage) gegen eine neue, sterilisierte ausgetauscht werden, damit man nicht Lysinspuren, die bereits in die ableitenden Dampfwege gelangt sind und noch aus der vorhergehenden Fraktion stammen, in die folgende Fraktion herüberschleppt. Zweitens muß man am Destillierkolben eine Hahnvorrichtung anbringen, um das Absinken des Druckes im Inneren des Kolbens während des Umwechselns der restlichen Apparatur zu verhindern; diesen Hahn öffnet man nach beendetem Austausch erst, bis der Druck in Vorlage und Kühler durch die Vakuumpumpe auf den Druck reduziert ist, der im Destillierkolben vor der Absperrung des Hahnes geherrscht hat. Wir haben dieses Schema in mehreren Versuchen angewendet und dabei bezeichnenderweise nur 2 Arten von Resultaten verzeichnet:

Entweder waren alle 3 Fraktionen lysinfrei oder nur die zweite, während die erste und die letzte Lysin enthielten, die erste in etwas größerer Menge als die letzte. Ein flüchtiger Körper kann nie ein derartiges Verhalten zeigen. Entspricht seine Flüchtigkeit der des Wassers, dann wird er in allen 3 Fraktionen auftreten, ist sie größer, so kann er evtl. nur in der ersten oder in der ersten und zweiten erscheinen. Das Überspringen der zweiten Fraktion, wie wir es beim Lysin konstatieren konnten, läßt sich nicht auf die Flüchtigkeit desselben, sondern nur auf die Verunreinigung der Destillate durch die infolge der Schaumbildung verspritzende Lysinbouillon beziehen.

Die zweite Methode, um der Blasenbildung und damit der Verunreinigung der Destillate aus dem Wege zu gehen, ist die Destillation bei normalem Luftdruck und bei niedriger Temperatur.

Gleich nach dem Erscheinen der Publikation von *Olsen* und *Yasaki* ließen wir Lysinbouillons in offenen Schalen bei 37° verdampfen und das Kondenswasser auf der Oberfläche von Agarplatten absetzen. Die Platten wurden dann nach verschiedener Expositionsdauer mit den dem Lysin zugeordneten Bakterien beimpft und bebrütet. Nie waren taches stériles zu beobachten; stets entstand ein zusammenhängender Rasen. Wir beabsichtigten, diese Versuchsanordnung zu verbessern, als *d'Herelle* die Mitteilung machte, es sei ihm durch Anwendung des gleichen Prinzipes geglückt, die Angaben von *Olsen* und *Yasaki* und ihre Interpretation in besonders überzeugender Weise zu widerlegen. Wir haben uns daher darauf beschränkt, noch einige Experimente mit dem von *d'Herelle* angegebenen Apparat anzusetzen.

Dieser Apparat besteht in einer großen Pulverflasche mit weitem, durch einen Gummipfropfen verschlossenen Hals. Durch eine Bohrung

des Pfropfens ist ein Reagensglas von 3 cm Durchmesser luftdicht durchgesteckt, an dessen unterer (geschlossener) Kuppe ein Glashaken angeschmolzen ist, an welchem man mit Hilfe von Platindraht ein Glasgefäß von 4 cm Durchmesser und 30—40 ccm Inhalt aufhängt. Das obere, außerhalb der Flasche befindliche, offene Ende des Reagensglases verschließt man durch einen doppelt perforierten Stopfen, durch den 2 Glasrohre hindurchgehen, die man mit Gummischläuchen derart an eine Wasserleitung anschließt, daß das Reagensglas beständig von Leitungswasser durchströmt und auf diese Weise gekühlt wird. Auf den Boden der Pulverflasche füllt man nun die Lysinbouillon, wobei jeder Kontakt mit dem Flaschenhals und jedes Verspritzen der Bouillon zu vermeiden ist. Dann werden Stopfen, Reagensglas und Schälchen eingesetzt, so daß der Innenraum gasdicht abgesperrt wird und das Schälchen einige Zentimeter über dem Flüssigkeitsspiegel hängt. Die Pulverflasche stellt man schließlich in ein Wasserbad von 45° und läßt das Wasser durch das Reagensglas zirkulieren. Die bei der genannten Temperatur flüchtigen Bestandteile der Lysinbouillon kondensieren sich an der Außenfläche des Reagensglases und tropfen in das Schälchen ab.

D'Herelle fand bei dieser Anordnung nie Lysin im Destillat. Er nahm aber auf die von *Doerr* und *Rose* beobachtete Labilität der Lysine in destilliertem Wasser keine Rücksicht, so daß seine Befunde infolge dieses Mangels zum Teile ihren Wert einbüßen. Daß dieser Einwand berechtigt ist, konnten wir leicht demonstrieren. Wir füllten in das Schälchen der *d'Herelle*schen Apparatur 5 ccm eines Dysenterielysins vom Titer $e_L = 4$, das durch entsprechende Verdünnung einer Lysinbouillon mit destilliertem Wasser hergestellt worden war. Auf den Boden der Flasche gaben wir 20 ccm gewöhnliche lysinfreie Bouillon und setzten das System in Betrieb, bis die Bouillon zur Trockene eingedampft war. Der Titer des Lysins im Schälchen war inzwischen (unter Anrechnung der Verdünnung durch das hinzugekommene Destillat) auf 2 abgesunken; wäre die Konzentration des Lysins von vornherein niedriger gewesen (z. B. $e_L = 1$), so wäre es ganz verschwunden oder nicht nachweisbar geworden. Diese Eventualität muß man natürlich auch bei der Versuchsanordnung *d'Herelles* berücksichtigen; es könnte sich Lysin im Schälchen ansammeln, aber bei der langen Dauer der Destillation wieder zerstört werden.

Um daher den Experimenten von *d'Herelle* entscheidende Beweiskraft zu verleihen, muß man die Deteriorierung der möglicherweise mit dem Wasserdampf übergehenden Lysine hintanhalten, was — wie schon an anderer Stelle erwähnt — am besten so geschieht, daß man in das für die Aufnahme des Destillates bestimmte Schälchen vor Beginn des Versuches etwas (5 ccm) sterile Bouillon einfüllt. Wir können

nun auf Grund unserer mit dieser Vorsichtsmaßregel angestellten Nachprüfungen die Aussage von *d'Herelle* bestätigen, daß die Lysine niemals im Destillat auftreten, auch dann nicht, wenn man Lysinbouillon bis zur Trockene eindampft.

Eine kurze Bemerkung sei noch den bei den Destillationen resultierenden Trockenrückständen gewidmet. In der Literatur stößt man an vielen Orten auf die Behauptung, daß Lysine das völlige Eintrocknen ohne Schaden vertragen, was nicht ganz richtig ist. Vielmehr konnten wir (in Übereinstimmung mit *Gildemeister* und *Herzberg*) feststellen, daß das Eintrocknen eine ziemlich beträchtliche Verminderung der absoluten Lysinmenge zur Folge hat. Wir bestimmten bei unseren Versuchen den e_L der Lysinbouillon meist nicht nur vor Beginn der Destillation, sondern prüften auch den Lysingehalt des Trockenrückstandes, indem wir denselben in einer dem Ausgangsvolum entsprechenden Menge destillierten Wassers lösten und die Lösung nach *Appelmans* und *Wertheman* austitrierten. 35 derartige vergleichende Auswertungen ergaben

daß in 4 Fällen keine Verminderung des Lysingehaltes eingetreten war,
daß in 13 Fällen 90%,
in 7 Fällen 99% und
in den restlichen Fällen ein noch größerer Anteil des Lysins zerstört worden war.

Es zeigte sich ferner, daß die Lysinschädigung nur dann eintritt, wenn man die Eindampfung bis zur völligen Austrocknung treibt. Engt man dagegen z. B. 70 ccm Lysinbouillon auf 4,5 ccm ein, so läßt sich kein Lysinverlust konstatieren. Lysinpartikel, die eine einmalige Eintrocknung überstanden haben, sind gegen erneute Eintrocknung nicht widerstandsfähig. Ist z. B. der Lysintiter vom Lysinexponenten 10 durch Austrocknung auf 8 reduziert, so wird eine weitere Reduktion erfolgen, wenn man den gelösten Rückstand neuerlich im Vakuum trocknet. Es liegen also hier analoge Verhältnisse vor wie bei der wiederholten Einwirkung höherer lysinschädigender Temperaturen.

Schlußfolgerungen.

1. Die Behauptung, daß die Lysine flüchtige Substanzen seien (*Olsen* und *Yasaki*), läßt sich nicht aufrecht erhalten.

2. Es können allerdings bei Destillationen lysinhaltiger Bouillonproben Lysinspuren ins Destillat übergehen; dieser Übergang erfolgt jedoch auch unter gleichen Versuchsbedingungen nur in einem gewissen Prozentsatz der Experimente und nur dann, wenn die lysinhaltigen Flüssigkeiten infolge des Siedevorganges verspritzen und die abziehenden Wasserdämpfe verunreinigen.

3. Wird das Sieden der Lysinbouillon vermieden, so bleiben die Destillate lysinfrei.

4. Eine Redestillation von lysinhaltigen Destillaten ist nach unseren Erfahrungen überhaupt nicht möglich.

5. Desgleichen vermochten wir nicht, Lysin durch Durchleiten von Luft aus einer wässerigen Lösung zu entfernen und in einem zweiten Gefäße durch Abkühlung der Luft zu kondensieren.

6. Die Versuche von *Olsen* und *Yasaki* nehmen ebensowenig wie die der anderen Autoren auf die von *Doerr* und *Rose* beschriebene Lysinzerstörung im salzarmen Medium durch niedrige Temperaturen Rücksicht und rechtfertigen daher nicht die aus ihnen gezogenen Schlüsse.

7. Durch Eintrocknen werden die Lysine partiell zerstört.

Literaturverzeichnis.

Olsen und *Yasaki*, Klin. Wochenschr. **2**, 41. 1923. **3**, 7. 1924. — *Doerr* und *Rose*, Schweiz. med. Wochenschr. **54**, 1. 1924. — *Gildemeister* und *Herzberg*, Klin. Wochenschr. **3**, 5 u. 7. 1924. — *d'Herelle*, Compt. rend. Société de Biologie **90**, 1, 1924. — *Flügge*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **25**. 1897. — *Dold*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **1**, 84. 1920. — *v. Angerer*, Arch. f. Hyg. **89**. 1920. — *Doerr* und *Zdansky*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **100**. 1923. — *Gratia* und *de Kruif*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **88**. 1923. — *Borchardt*, Klin. Wochenschr. **3**, 7. 1924. — *Zdansky*, Wien. klin. Wochenschr. Nr. 6. 1924.

Auch an dieser Stelle möchte ich meinem Lehrer, Herrn Professor R. Doerr, für seinen Rat und Hilfe bei meiner Arbeit meinen besten Dank aussprechen.